

· 方药研究 ·

补肾益气 and 血方对胚胎着床障碍小鼠 子宫内膜腺体凋亡的影响

黄冬梅 黄光英 陆付耳

(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 430030)

[摘要] **目的** 观察补肾益气 and 血方对胚胎着床障碍小鼠子宫内膜腺体凋亡的影响。**方法** 复制小鼠胚胎着床障碍模型, 分为对照组、模型组 and 治疗组, 每组 30 只。观察小鼠妊娠率 and 着床胚胎数, 分析子宫内膜腺体的凋亡情况, 检测子宫内膜腺体的增殖细胞核抗原 (PCNA)、bax、bcl-2 和激活型 Caspase-3 蛋白表达情况。**结果** 模型组妊娠率 and 平均着床胚胎数均显著降低, 治疗组两者均较模型组显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组子宫内膜腺体增殖指数 (PI) 明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而凋亡指数 (AI) 则明显低于对照组 ($P < 0.05$); 治疗组与模型组比较, 腺体 PI 明显降低而 AI 明显增高 ($P < 0.01$), 两者与对照组比较差异均无统计学意义。模型组子宫内膜腺体中 bax 和激活型 Caspase-3 蛋白显著低于对照组 ($P < 0.01$); 治疗组两者则显著高于模型组 ($P < 0.01$); 治疗组与对照组差异无统计学意义。**结论** 促进子宫内膜腺体中 bax 蛋白的表达 and Caspase-3 的激活, 调节植入窗期腺体细胞增殖 and 凋亡的平衡, 可能是补肾益气 and 血方促进子宫内膜接受性建立 and 改善胚胎着床障碍的机制之一。

[关键词] 胚胎着床障碍; 细胞凋亡; PCNA; bax; bcl-2; Caspase-3; 补肾益气 and 血方

Effect of Bushen Yiqi Hexue Recipe on the Endometrial Gland Apoptosis in Blastocyst Implantation Dysfunctional Mice

HUANG Dong-mei, HUANG Guang-ying, LU Fu-er

(Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Bushen Yiqi Hexue Recipe (Recipe to reinforce kidney, replenish qi and harmonize blood) on the endometrial gland apoptosis in blastocyst implantation dysfunctional mice. **Methods** The mice models of blastocyst implantation dysfunction were made and divided into control, model and treated groups with 30 in each. Pregnancy rate, number of implantation blastocysts, the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), bax, bcl-2 and activated Caspase-3 were observed. **Results** Compared with the control group, pregnancy rate and mean implanted blastocysts in the model group were remarkably reduced. Compared with the model group, pregnancy rate and mean implanted blastocysts in the treated group were significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Comparing with the control group, proliferation index (PI) of endometrial gland in the model group was dramatically elevated ($P < 0.01$), whereas apoptosis index (AI) was dramatically reduced ($P < 0.05$). Comparing with the model group, PI of endometrial gland in the treated group was obviously inhibited, while AI was significantly improved ($P < 0.01$), both showed no remarkable difference from those of control group. Bax and activated Caspase-3 protein expressions of endometrial gland in the model group was remarkably lower than in the control group ($P < 0.01$), and these expressions in the treated group was significantly higher than in the model group ($P < 0.01$), but there was no significant difference in comparison of the treated group with the control group. **Conclusion** It is suggested that increasing bax and activated Caspase-3 expression and regulating the imbalance of apoptosis and proliferation in endometrial gland may be one of the mechanisms of Bushen Yiqi Hexue Recipe in improving uterine receptivity and eventually promoting blastocyst implantation.

Key Words Blastocyst implantation dysfunction; Apoptosis; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); bax; bcl-2; Caspase-3; Bushen Yiqi Hexue Recipe (Recipe to reinforce kidney, replenish qi and harmonize blood)

胚胎着床障碍已成为临床上制约妊娠成功的一个瓶颈因素, 从促进子宫内膜接受性的建立方面改善胚胎着床, 是临床上治疗不孕不育的一个重要突破口。着床窗期子宫内膜腺体细胞的凋亡是子宫内膜接受性建立的一个重要特征。

补肾益气 and 血方在临床上证实能有效改善多次体

外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 失败患者的胚胎着床^[3], 为探讨其作用机理, 本研究从子宫内膜腺体细胞的凋亡以及相关调控因素方面观察了补肾益气 and 血方对子宫内膜接受性建立的影响。

1 材料

1.1 动物

清洁级昆明小鼠, 雌性小鼠 100 只, 雄性小鼠 20 只, 8~12 周龄, 体重 28~30g, 由湖北省卫生防疫站提

供,合格证号:19-082。

1.2 药物

补肾益气 and 血方组成:桑寄生 18g,丹参 14g,黄芪 9g,当归 9g,川芎 9g。该方由同济医院中西医结合研究所采用水煎醇沉工艺制成浸膏,每毫升含生药 3.75mg。米非司酮溶液为将米非司酮片(北京第三制药厂生产,批号:010413,25mg/片)研碎后溶于丙二醇,浓度为 0.8mg/ml。

1.3 试剂

增殖细胞核抗原(PCNA)抗体为美国 Neomarker 公司产品,细胞凋亡相关基因 bax、bcl-2 抗体为美国 SantaCruz 公司产品,激活型 Caspase-3 抗体为为 R&D 公司产品,SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品,原位细胞凋亡检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

2 方法

2.1 动物分组及处理

上述昆明小鼠雌雄以 2:1 合笼,次晨检查阴栓,发现阴栓者记为妊娠第 1 天(Pd1)。将妊娠雌鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,每组 30 只。从 Pd1 开始,治疗组每日上午灌服中药 0.2ml/只,对照组和模型组灌服等量生理盐水。Pd4 上午 7~8 时,模型组和治疗组皮下注射米非司酮溶液 0.1ml,对照组注射等量溶剂丙二醇。于 Pd4 晚 21:30~22:00 每组各 10 只小鼠颈部脱臼处死,剖腹取子宫,子宫一角置 4%多聚甲醛中固定并石蜡包埋,另一角置液氮中保存。每组剩余各 20 只小鼠于 Pd7 处死,观察其妊娠率和着床胚泡数。

2.2 PCNA、bax、bcl-2 和激活型 Caspase-3 蛋白的检测

采用免疫组织化学 SP 法。PCNA 阳性细胞表现为胞核染成棕黄色,在光学显微镜下每例随机选取 10 个高倍视野,计数阳性细胞的百分率,即增殖指数(PI)。Bax、激活型 Caspase-3 和 bcl-2 阳性细胞为胞质着棕黄色。bax、激活型 Caspase-3 和 bcl-2 结果经 HPIAS-1000 病理图文分析系统(同济医学院千屏音像公司)分析,计算阳性信号的积分光度(表示蛋白的表达量)。

2.3 凋亡细胞的检测

采用 TUNEL 法分析。胞核中着棕黄色颗粒为阳性细胞。在光学显微镜下每例随机选取 10 个高倍视野,计数阳性细胞的百分率,即凋亡指数(AI)。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 χ^2 检验和 t 检验进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠妊娠率和平均着床胚泡数比较

表 1 示,与对照组比较,模型组妊娠率和平均着床胚泡数均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);治疗组的妊娠率及平均着床胚泡数均较模型组显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但平均着床胚泡数仍低于对照组($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠妊娠率和平均着床胚泡数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	妊娠率(%)	平均着床胚泡数(个)
对照组	20	90	14.67±1.35
模型组	20	25*	7.67±1.34**
治疗组	20	55△	12.31±0.75*△△

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3.2 各组小鼠子宫内膜增殖和凋亡情况比较

表 2 示,模型组子宫内膜腺体 PI 明显高于对照组($P < 0.01$);治疗组与模型组比较,腺体 PI 明显降低($P < 0.01$),与对照组比较差异无统计学意义。模型组子宫内膜腺体 AI 明显低于对照组($P < 0.05$);治疗组与模型组比较,腺体 AI 明显增高($P < 0.01$),与对照组比较无明显区别。各组子宫内膜基质细胞 PI 和 AI 差异均无统计学意义。

表 2 各组小鼠子宫内膜增殖和凋亡情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	PI		AI	
		腺体	基质	腺体	基质
对照组	10	0.131±0.06	0.474±0.02	0.193±0.09	0.037±0.008
模型组	10	0.368±0.05**	0.443±0.04	0.077±0.01*	0.040±0.008
治疗组	10	0.185±0.02△	0.45±0.02	0.12±0.02△	0.036±0.007

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3.3 各组小鼠子宫内膜 bax、bcl-2 和激活型 Caspase-3 蛋白的表达

表 3 各组小鼠子宫内膜 bax、bcl-2 和激活型 Caspase-3 蛋白的平均积分光度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	bax	bcl-2	激活型 Caspase-3
对照组	10	36.73±7.63	17.20±22.9	30.73±1.30
模型组	10	17.35±1.50**	10.63±6.00	22.14±2.58**
治疗组	10	28.99±7.42△△	11.02±11.91	25.99±2.83*△

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 3 示,模型组 bax 蛋白平均积分光度值显著低于对照组($P < 0.01$),治疗组则显著高于模型组($P < 0.01$),治疗组与对照组差异无统计学意义,bax 蛋白在子宫内膜表面上皮和腺上皮中表达。各组 bcl-2 平均积分光度值差异无统计学意义。模型组激活型

Caspase-3 蛋白的平均积分光度值显著低于对照组 ($P < 0.01$), 治疗组则显著高于模型组 ($P < 0.05$), 但仍低于对照组 ($P < 0.05$)。

4 讨论

植入窗期子宫内膜发生复杂而精细的变化, 形成有利于胚泡着床的局部微环境。其中恰在此期开始出现的腺上皮细胞的凋亡与子宫内膜接受性的建立密切相关。Von RU 等^[1]发现, 在月经周期第 19 至 20 天子官内膜基底层腺上皮中开始出现细胞凋亡, 随后它扩展至功能层的腺上皮细胞中。增殖反应和 bcl-2 的表达此时仅限于基质部分。他们认为此时腺体细胞的凋亡在子宫内膜接受性的建立中具有重要意义。bcl-2 的表达消失和 bax 表达增高是导致此时腺体细胞凋亡的原因之一。Gao F^[2]等发现, 在小鼠 Pd4 下午, 即小鼠胚泡着床前期(小鼠胚泡在 Pd4 的 22~24 时开始着床), 子宫内膜腺体中出现凋亡细胞, 经米非司酮处理后, 腺体细胞凋亡数目明显减少, 从而影响了子宫内膜接受性的建立。

肾主生殖, 不孕症多因肾虚而致胎元不固, 故补肾益气和血方中以桑寄生为君药填补肾精; 又因先天后天互滋互生, 故臣以黄芪健后天脾气, 以充先天, 兼具固托胎元之功效; 不孕症常常伴有瘀阻冲任, 胞脉胞络不畅, 以致无法摄精成孕, 故本方伍养血调血和血之品(丹参、当归、川芎)以畅达冲任。该方临床疗效较为满意^[3]。提高妊娠率与腺体细胞的凋亡与子宫内膜接受性的建立密切相关, 小鼠胚泡一般在 Pd4 的 22~24 时开始着床, 我们选择胚泡正待植入之前, 即 Pd4 晚 21:30~22 时取材, 主要是考虑到此时子宫内膜接受性建立与否对于胚泡的植入至关重要。实验发现, 皮下注射米非司酮明显降低小鼠的妊娠率和着床胚泡数, 子宫内膜腺体细胞的凋亡明显减少, 而增殖反应相对活跃。给予补肾益气和血方后子宫内膜腺体细胞的凋亡明显增多、增殖反应减少, 与正常相比无明显区别, 增殖反应主要位于基质中, 表明补肾益气和血方能够改善胚泡着床障碍小鼠子宫内膜腺体细胞增殖和凋亡的紊乱, 从而促进子宫内膜接受性的建立。

bcl-2 家族是细胞凋亡的主要调节者, 研究较多的是 bcl-2 和 bax。bax 自身结合形成同源二聚体发挥其促凋亡作用, 当 bcl-2 表达增多, 和 bax 结合形成异源二聚体, 从而起到抗凋亡的作用。而它们介导细胞凋亡必须通过激活 Caspases 家族。Caspase-3 是激活细胞凋亡的关键性激酶, 也是细胞凋亡的主要效应分子。Caspase-3 一旦被活化, 即代表不可逆转的细胞凋亡。

本实验发现, 植入窗期 bax 在子宫内膜腺上皮和表面上皮中高表达, 尤以腺上皮表达为甚, bcl-2 则在

基质中表达。米非司酮能降低 bax 在腺上皮的表达, 而对基质中 bcl-2 的表达无影响。补肾益气和血方能够改善胚泡着床障碍小鼠子宫内膜腺体细胞中 bax 的低表达。着床窗期子宫内膜表面上皮和腺上皮中均表达活化型 Caspase-3, 尤以腺上皮中表达为甚, 基质中几乎无表达。在 Pd4 给予米非司酮后, 活化型 Caspase-3 在腺上皮中的表达明显被抑制。而补肾益气和血方则明显改善活化型 Caspase-3 在胚泡着床障碍小鼠子宫内膜腺上皮中的表达。

以上结果表明, 在胚泡着床窗期, 腺上皮中大量表达 bax 和活化型 Caspase-3, 腺上皮细胞出现凋亡。腺上皮中 bax 和活化型 Caspase-3 表达的降低可能是米非司酮导致腺体细胞凋亡不足、增殖亢进的机制之一, 而补肾益气和血方可通过促进腺体中 bax 和活化型 Caspase-3 的表达, 调节腺体细胞凋亡和增殖的紊乱, 从而有助于子宫内膜接受性的建立, 最终改善胚泡着床障碍。

参考文献

- [1] Von RU, Classen LI, Krusche CA, et al. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. Hum Reprod, 1998, 13(11): 3177~3189.
- [2] Gao F, Xu FH, Zhou XC, et al. Mifepristone regulates expression of apoptosis related genes Fas and FasL in mouse endometrium. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(6): 524~529.
- [3] 张明敏, 黄光英, 陆付耳. 补肾益气活血汤对多次助孕技术失败患者结局的影响. 微循环学杂志, 2002, 12(2): 10~12.

(收稿日期: 2007-04-05; 修回日期: 2007-07-20)

[编辑: 行之/邓媛]

聚杰杯首届心血管疾病学术研讨会征稿通知

为研究心血管领域的临床经验与学术成果, 拟于 2008 年 10 月在南京召开“聚杰杯首届心血管疾病学术研讨会”。现征稿如下: 心血管系统各种疾病的诊治经验、研究、文献整理、综述; 新药物、新疗法在心血管系统各种疾病治疗中的临床应用; 脑血管疾病与糖尿病的相关研究。请注明“心血管”。

为研究我国诊疗专家资源分布现状与特色诊疗技术, 我们拟汇编《当代中国特色诊疗专家》, 汇编分“上卷·专家业绩”、“下卷·专家经验”两部分。上卷征集医术医德在当地百性中获得广泛赞誉的医务人员的简历, 在简历中要详尽地介绍业绩、学识与诊疗特色、联系方式。下卷征集各种特色诊疗技术(包含中医、民族医药、针灸、推拿、外治法等)治疗专科病、多发病、疑难病的临证思路与经验。请分别注明“上卷”、“下卷”。

录用稿件将按《中华人民共和国著作权法》发放稿酬, 细则请见录用通知。截稿日期: 2008 年 8 月 30 日。稿件请寄: 南京市商埠街 27 号, 南京聚杰医药科技研究中心学术部收, 邮编: 210011, 电话: (025) 86054929、86054939。电子邮件: xsb@huaxia120.com。

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中华人民共和国药典》规定的质量要求生产, 符合药用各项指标, 有 0 号、1 号、2 号等型号, 多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格: 每万粒 135 元(含邮资)。

地址: 浙江新昌县一诺胶丸有限公司, 邮政编码: 312560

电话: (0575) 86061888, 013706852676, 联系人: 潘炎锋